

N° D'ORDRE
99 - 2^e Série

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA

FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

M. André COLLET

Pharmacien

Ex-chargé de travaux

Lauréat de la Faculté

Né le 27 septembre 1911 à Nancy

CONTRIBUTION

à l'étude de la polypeptidorachie

L'index tyrosine polypeptidique du liquide
céphalo-rachidien

Soutenue le 12 Janvier 1937 devant la Commission d'examen

MM. PASTUREAU	Président
CORDEBARD	Juges
VERNIER	

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1937

N° D'ORDRE
99 - 2^e Série

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA

FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

M. André COLLET

Pharmacien

Ex-chargé de travaux

Lauréat de la Faculté

Né le 27 septembre 1911 à Nancy

CONTRIBUTION

à l'étude de la polypeptidorachie

L'index tyrosine polypeptidique du liquide
céphalo-rachidien

Soutenue le 12 Janvier 1937 devant la Commission d'examen

MM. PASTUREAU	Président
CORDEBARD	} Juges
VERNIER	

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1937

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen:

M. PASTUREAU, O , I , .

Assesseur:

M. LASSEUR, , I , .

Professeurs:

MM. DOURIS, I  ,  , 	Toxicologie.
PASTUREAU, O  , I  , 	Pharmacie chimique.
SEYOT,  ,  , I  ,  , 	Histoire naturelle.
LASSEUR,  , I  , 	Microbiologie.
N...	Matière médicale.
N...	Chimie organique.
N...	Pharmacie galénique.

Agrégé libre:

M. GIRARDET, , I  Chimie et Toxicologie.

Chargés de cours magistraux:

M. MEUNIER	Pharmacie galénique.
Mlle FRANÇOIS.	Matière médicale.
M. KAYSER.	Chimie.

Chargés de cours:

MM. VERNIER, I 	Zoologie.
CORDEBARD,  , I 	Analyse chimique.
DONZELOT, 	Physique.
MARCHAL	Hydrologie.

Chefs de travaux:

MM. VERNIER, I 	Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD,  , I 	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ, 	Micrographie.
DONZELOT (chargé de trav.) 	Physique.
RICHARD (chargé de travaux).	Pharmacie.
LASCÈVE (chargé de travaux)..	Chimie biologique et Toxicologie.

Secrétariat:

M. TRIBOLET, I  Secrétaire.

Doyens honoraires:

MM. BRUNTZ, O  ,  , I  , O  ,  , 	Recteur de l'Université de Nancy.
SEYOT,  ,  , I  ,  , 	Professeur d'Histoire naturelle.

Professeurs honoraires:

MM. GRELOT, , I , 
BRUNTZ, O , , I , O , , , .

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A MES GRANDS-PARENTS

et

A MES PARENTS

*Faible témoignage de piété filiale et
de reconnaissance infinie.*

1884
1885
1886



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MA FIANCÉE

et

A SES PARENTS

Témoignage de ma profonde affection.

A MON FRÈRE

et

A MA SŒUR

Bien affectueusement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR
DE VEZEAUX DE LAVERGNE,

Professeur de bactériologie à la Faculté de Médecine de Nancy
Sous-directeur du Service de Santé de la 20^e Région.

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOYEN PASTUREAU,
Officier de la Légion d'honneur.

A MES JUGES

Hommage respectueux.

AVANT PROPOS

Avant d'exposer notre travail, nous avons à cœur de nous tourner vers les Maîtres de la Faculté qui ont bien voulu nous aider et nous guider depuis le début de nos études.

Toute notre gratitude va vers Monsieur le Doyen Pastureau, qui, avant de nous faire l'honneur de présider la soutenance de cette thèse, nous a si souvent ouvert la porte de son laboratoire avec la plus grande bienveillance.

Que Monsieur Cordebard veuille bien agréer l'expression de notre respectueuse reconnaissance. Nous avons trouvé en ce bon Maître, un conseiller affectueux et avisé, et nous quittons avec regret le laboratoire d'analyses chimiques, où nous avons passé les meilleures heures de notre vie d'étudiant.

A Monsieur le Docteur Vernier, qui nous a fait l'honneur d'accepter de juger notre travail, nous témoignons toute notre reconnaissance.

Nous présentons nos remerciements bien respectueux à Monsieur V. de Lavergne, Professeur à la Faculté de Médecine qui, après nous avoir accueilli dans son laboratoire, a bien voulu nous fournir les nom-

breux liquides pathologiques nécessaires à nos recherches.

Notre reconnaissance va aussi à Monsieur le Médecin-Capitaine Accoyer, près duquel nous avons trouvé des conseils judicieux.

Bien affectueusement, nous remercions nos camarades médecins Duret et Giudicelli, et notre ami L. Louis, pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée.

CONTRIBUTION
à l'Étude de la Polypeptidorachie

L'index tyrosine polypeptidique

Rachidien

CONTRIBUTION à l'Étude de la POLYPEPTIDORACHIE

L'Index tyrosine polypeptidique du liquide
céphalo-rachidien

INTRODUCTION

Si plusieurs essais ont été proposés pour simplifier l'estimation de la polypeptidémie, en lui substituant la notion nouvelle d'*Index-tyrosine* du sérum sanguin suggérée par GOIFFON, le dosage de la polypeptidorachie, en est resté au mode opératoire proposé par CRISTOL et modifié par FIESSINGER: seul le procédé de détermination par micro-kjeldahlisation est donc utilisé dans les laboratoires.

De nombreuses difficultés techniques, des manipulations longues, un matériel important et délicat, obligent trop souvent le biologiste à renoncer au dosage des peptides rachidiens.

Le travail que nous exposons a pour but de substituer à l'estimation de l'azote peptidique, la détermination d'une valeur appelée Index-Tyrosine rachidien.

Dans ce but, la méthode colorimétrique de LEFAUX que nous avons expérimentée sur des liquides provenant de méningites toxiques seulement, devait nous fournir, grâce à ses qualités de simplicité, de sensibilité et de rapidité, un mode opératoire de choix.

Nous avons tenu à grouper, sous une forme succincte le maximum de renseignements concernant l'étude quantitative des polypeptides; c'est pourquoi nous avons cru devoir signaler les différentes méthodes de dosage relatives au sérum sanguin, à l'urine et au liquide céphalo-rachidien.

D'ailleurs les principes et les techniques employés pour l'estimation de la polypeptidémie et de la polypeptidorachie sont identiques, bien qu'appliqués à des liquides dont les densités protidiques sont très différentes.

Pour l'exposition de notre travail, nous avons adopté le plan suivant:

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES POLYPEPTIDES

CHAPITRE I. — *Les polypeptides.*

- 1° Exposé chimique et biologique.
- 2° Historique des recherches quantitatives.

CHAPITRE II. — *Exposé et critiques des différentes méthodes de dosages dont les résultats sont exprimés:*

1° En azote:

- a) Méthodes de dosage chimique par kjeldahlisation;
- b) Méthodes de dosage colorimétrique.

2° En tyrosine:

- a) Méthode de GOIFFON;
 - b) Méthode de LEFAUX.
-

DEUXIÈME PARTIE

MESURE DE L'INDEX-TYROSINE POLYPEPTIDIQUE RACHIDIEN

CHAPITRE I. — *Adaptation des méthodes colorimétriques au liquide céphalo-rachidien.*

1° Adaptation de la technique de GOIFFON. —
Critiques des résultats.

2° Modifications personnelles apportées au mode
opératoire de LEFAUX.

CHAPITRE II. — *Résultats obtenus; comparaison de
l'index tyrosine avec les autres éléments rachidiens.*

CONCLUSIONS.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE QUALITATIVE
ET
QUANTITATIVE
DES
POLYPEPTIDES

CHAPITRE PREMIER

LES POLYPEPTIDES

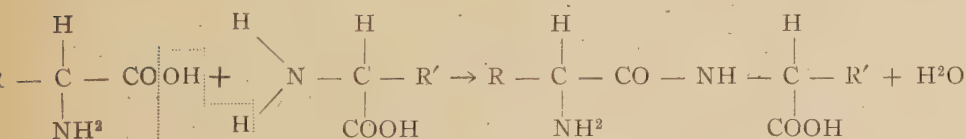
1° Exposé chimique et biologique

A) Etude chimique

D'après CRISTOL, les polypeptides sont des composés chimiques intermédiaires entre les protéides et les monopectides ou acides aminés.

Un protéide est un colloïde naturel composé, en effet, de polypeptides, ces polypeptides étant eux-mêmes formés soit d'acides aminés combinés les uns aux autres, soit de monopectides auxquels se rattachent des restes uroniques.

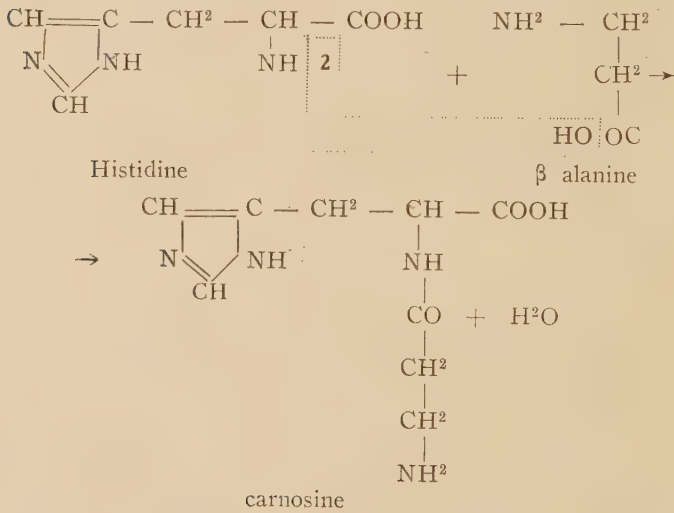
En se condensant, les monopectides se soudent entre eux, perdent une molécule d'eau, la fonction acide d'un radical acide réagissant sur une fonction amine.



De grosses molécules peuvent ainsi se bâtir par condensations successives. Leur hydrolyse régénère les acides aminés.

Des polypeptides naturels ont été décelés dans les tissus:

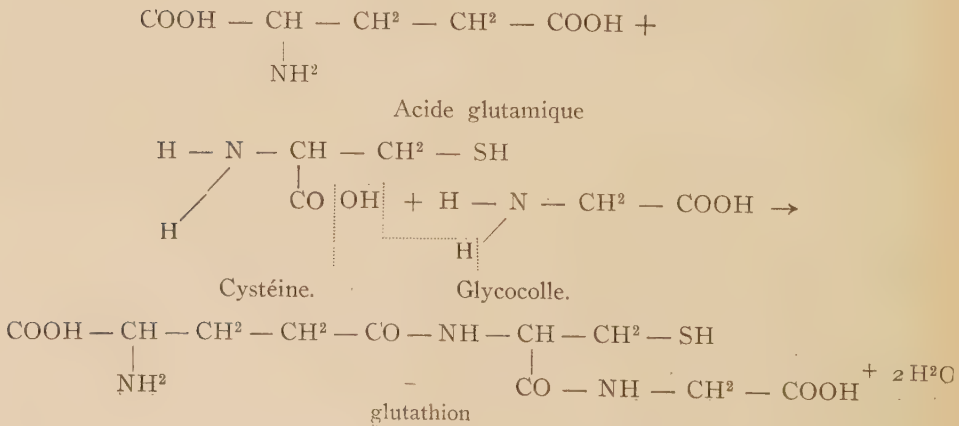
Carnosine: condensation de l'Histidine + β Alanine.



Ansérine ou méthyl-carnosine.

Glutathion: produit de condensation de:

Acide glutamique + (cystéine + glycocole).



L'évolution physio-pathologique du glutathion est très importante: ce polypeptide se trouve dans tous les organes: tissus, muscles, sang, glandes endocrines.

Le glutathion est précipité par le lactate de cadmium et dosé par une solution titrée d'iode (1-2).

L'insuline elle-même a révélé dans sa molécule incomplètement analysée de la cystéine, de l'acide glutamique, de la leucine, de l'arginine, de l'histidine et de la lysine. Elle est donc formée de molécules monopeptidiques très condensées.

Certaines vitamines B seraient, elles aussi, formées de polypeptides.

Quelques propriétés importantes des polypeptides.

Les polypeptides sont en général, solubles dans l'eau. Les composés les plus simples sont cristallisés et légèrement sucrés; les homologues supérieurs, tétra-peptides, ne le sont presque plus; les octopeptides sont gélatineux (colloïdes) et amers. Leurs propriétés se rapprochent peu à peu de celles des protéides, à mesure que la molécule grossit.

Ils précipitent par la chaleur, et moussent par agitation. Possédant presque tous des carbones asymétriques, ils ont une action sur la lumière polarisée.

Les acides minéraux, le tanin, l'acide phosphotungstique, la solution saturée de sulfate d'ammonium, les précipitent.

(1) L. BINET et G. WEILLER. — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 11-940.

(2) L. BINET. — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, 116-1239.

Les polypeptides donnent les réactions caractéristiques des noyaux renfermés dans leur molécule:

1° *Réaction xanthoprotéique:*

Caractérisation du noyau phénolique

Une solution ou une pseudo-solution de polypeptides, additionnée d'acide nitrique concentré, précipite le plus souvent, mais dans tous les cas on obtient, à chaud, une coloration jaune.

2° *Réaction de MILLON:*

Caractérisation du noyau phénoxy- et de la tyrosine

A chaud, précipité rouge brique, avec une solution de nitrate acide de mercure.

La phénoxy-alanine ne donne pas cette réaction.

3° *Réaction du biuret:*

Caractérisation de la liaison amidique

Une solution polypeptidique additionnée de soude et d'une trace de solution diluée de SO^4Cu , donne une coloration violet pourpre.

4° *Réaction d'ADAMSKIEWITZ modifiée par VOISENET:*

Caractérisation du tryptophane

Si l'on verse à la surface d'un mélange d'acide acétique et d'une solution nitrique de formol, une solution

de polypeptides, il se produit à la zone de séparation un anneau violet; cette coloration envahit toute la masse par chauffage.

5° Réaction d'ABDERHALDEN:

Caractérisation des acides aminés

Une solution de polypeptides, chauffée avec quelques gouttes de nihydrine, donne une belle coloration violette.

B) Etude biologique

a) *Polypeptides dans le sang.*

Dans l'organisme, les protéides ingérés subissent la transformation chimique: simplifiés en polypeptides par hydrolyse, dans l'estomac puis dans l'intestin, grâce à l'acide chlorhydrique et aux diastases, ils passent dans la circulation, ainsi dégradés, par la veine porte. Le foie les arrête pour les transformer, d'une part en acides aminés, ammoniacque et urée, et d'autre part en acides cétoniques.

Il a été remarqué qu'à la suite d'un repas riche en protéines, on ne trouve pas d'augmentation notable du taux de polypeptides sériques. Cependant, l'analyse du sang de la veine porte en montre une quantité importante. C'est donc bien le foie qui est l'agent de transformation, et une insuffisance hépatique se traduira par une variation plus ou moins considérable de

la quantité de polypeptides dans le sang, d'où l'importance de l'exploration du foie dans le métabolisme des protides (3).

Néanmoins le sang contient une quantité normale de polypeptides et d'acides aminés: d'après CRISTOL, le sérum renferme, par litre, environ 50 à 60 mg. d'azote mono-peptidique et 10 à 20 mg. d'azote polypeptidique (4).

b) *Polypeptides de l'urine.*

Les matières protéiques dégradées sont éliminées par l'urine; à l'état normal, on en trouve de très petites quantités, quelques milligrammes par litre. Mais dans certains cas pathologiques (ictères-néphrites) le taux peut s'élever, et atteindre plusieurs centigrammes par litre.

On trouve parfois dans le sédiment urinaire des cristaux de tyrosine, sous forme de houppes et d'aigrettes, et de l'alanine ayant l'aspect de sphérules ternes.

Le dosage des polypeptides urinaires, mis au point par GOIFFON, est une adaptation à l'urine de la méthode colorimétrique de mesure de l'index tyrosine sérique, exposée plus loin (5).

(3) N. FIESSINGER et H. WALTER. — Nouveaux procédés d'exploration fonctionnelle du foie. Paris, Masson, 1934, 115.

(4) P. CRISTOL. — Précis de Chimie Biologique Médicale. Paris, Masson, 1935, 489.

(5) R. GOIFFON et J. SPAEY. — Détermination colorimétrique de l'Index-Tyrosine des polypeptides urinaires. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 1686.

c) *Polypeptides du liquide céphalo-rachidien.*

L'étude de la polypeptidorachie est beaucoup plus complexe.

FIESSINGER (6) a démontré le premier la présence de polypeptides dans le liquide céphalo-rachidien. Leur origine est-elle locale, ou se rattache-t-elle au métabolisme général? Des dosages comparatifs effectués à la fois sur le liquide et sur le sérum sanguin, ont permis de démontrer que l'hyperpolypeptidémie ne provoquait pas obligatoirement l'hyperpolypeptidorachie, thèse en faveur de la « Barrière méningée aux polypeptides ».

Dans les cas d'insuffisance hépatique ou rénale, on a cependant remarqué une élévation du taux peptidique rachidien, mais sans parallélisme régulier avec le taux peptidique sérique. Il y aurait là une polypeptidorachie d'origine générale, témoignant de la diffusion différente des polypeptides dans le sang et dans le liquide cérébro-spinal.

Dans certaines affections strictement méningées, on a pu constater une polypeptidémie normale avec hyperpolypeptidorachie, d'où une origine locale évidente: polypeptidotoxie tissulaire.

FIESSINGER puis PRUNELL estiment qu'« il est possible de trouver des polypeptides d'origine neurologique, dans quelques affections méningées ou encé-

(6) N. FIESSINGER, L. MICHAUX et M. HERBAIN. — La barrière méningée aux polypeptides. *C. R. Soc. Biol.*, 29 mars 1930, p. 1099.

phaliques, et particulièrement au cours de la réabsorption de certaines collections hémorragiques » (7).

Ces mêmes auteurs ont constaté de plus qu'il n'existait aucun élément de comparaison possible entre les polypeptides rachidiens d'une part, et la cytologie, la teneur en albumine, les réactions globuliniques, les réactions colloïdales et l'uréorachie d'autre part.

Nous avons cependant pu observer, dans de nombreux cas de méningites toxiques, un parallélisme relatif entre la cytologie, le taux d'albumine et l'index-tyrosine rachidien. La comparaison avec les éléments chimiques semble n'avoir aucune valeur.

Il faut préciser que les observations de PRUNELL ont été effectuées sur des affections chroniques (paralysie générale) alors que les nôtres résultent de l'examen de cas méningés aigus. La durée de l'évolution du type pathologique aigu et du type chronique suffit à expliquer la différence des résultats.

L'estimation des polypeptides jouera donc, en biologie un rôle important dans le pronostic et le diagnostic d'affections hépatiques ou rénales (polypeptidémie et polypeptidurie), ou de réactions méningées d'origines inflammatoire et autolytique (polypeptidorachie).

(7) A. PRUNELL. — Polypeptidémie et Polypeptidorachie dans la paralysie générale. Dissociation cyto-polypeptidique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, p. 1082.

2° Historique

En 1912, FOLIN et DENIS, étudiant les variations de l'azote non protéique, croient à la présence d'acides aminés dans le sang et proposent une technique de dosage colorimétrique.

ABDERHALDEN, grâce à la réaction à la nihydrine, caractéristique des monopectides, confirme les résultats de FOLIN. VAN SLYKE et MEYER cherchent à établir leur rôle dans l'organisme, et établissent la toxicité de leur produit de condensation: les polypeptides. En 1922, VAN SLYKE et HILLER (8) font paraître une étude sur la précipitabilité des protéides.

En 1926, PUECH et CRISTOL publient une méthode de dosage de la polypeptidémie. Cette méthode est basée sur des défécations trichloracétique et phosphotungstique du sérum, puis dosage de l'azote des filtrats après kjeldahlisation. Le procédé de désalbumination, résultant des travaux de VAN SLYKE, sera repris dans toutes les techniques proposées ultérieurement et adaptées aux différents modes opératoires.

En 1928, MARTENS propose la mesure de la peptidémie par emploi du réactif coloré des acides aminés de FOLIN. La différence entre les quantités d'azote obtenu par dosage avant et après hydrolyse du sérum correspond à l'azote polypeptidique.

Le dosage des polypeptides dans les solutions pro-

(8) VAN SLYKE et A. HILLER. — A Study of certain protein precipitants. *Journ. of Biol. Chem.*, 1922, 53, p. 253.

tidiques à concentrations variables, de FIESSINGER et HERBAIN (9) tend à mettre en évidence le rôle important de la dilution lors de la manipulation des liquides biologiques examinés, dilution qui pourrait faire varier le taux d'azote et causer des erreurs considérables.

Ces mêmes auteurs étudiant plus spécialement la polypeptidorachie lui adaptent la méthode du « Double azote » de CRISTOL. Aucune autre publication concernant le dosage des peptides rachidiens n'est parue jusqu'à ce jour, si bien que cette technique est la seule employée dans les laboratoires.

GOIFFON et SPAEY (1934) orientent différemment l'étude expérimentale: ils proposent, non plus l'estimation de l'azote peptidique, mais le dosage colorimétrique d'un monopeptide facilement décelable, la tyrosine dont les variations sont à peu près identiques à celles des polypeptides, produits de condensation d'acides aminés, dont le noyau tyrosinique est un des plus réguliers constituants. Leur technique ne nécessite qu'un appareillage restreint, et n'utilise qu'une faible quantité de matériel à analyser; la réaction n'est pas immédiate, mais la lecture colorimétrique est aisée.

Tout récemment (décembre 1935) LEFAUX a utilisé dans le même but une autre réaction colorée des phénols: la réaction xanthoprotéique, plus sensible et plus rapide encore que la précédente.

(9) N. FIESSINGER et M. HERBAIN, — Les dosages des polypeptides dans les solutions protidiques à concentration variable. *C. R. Soc. Biol.*, 5 avril 1930, p. 1211.

Grâce à ces méthodes de détermination facile, les polypeptides, corps dont les propriétés, physiques, chimiques, biologiques et pathologiques sont exactement déterminées, ont pris une grande importance dans la biologie expérimentale, comme en témoignent les nombreuses observations et l'abondance de résultats cliniques publiés à leur sujet.

CHAPITRE II

Exposé et critiques des différentes méthodes de dosages des Polypeptides

1^o Dosage de l'azote polypeptidique

A) Méthodes chimiques

dont les résultats sont exprimés en Azote

Le mode opératoire de toutes les méthodes comporte une manipulation identique, celle de la défécation du liquide à analyser:

Les protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique, à certaines concentrations bien déterminées, inférieures à 30 %, tandis que les molécules polypeptidiques, plus simples, passent dans le filtrat où elles peuvent être mises en évidence par les réactions du biuret et de TANRET; l'acide phosphotungstique, au contraire précipite intégralement et les protéides et les composés intermédiaires. Les mêmes réactions pratiquées sur le filtrat de défécation sont négatives.

La différence de teneur en azote des deux filtrats correspond donc à l'azote polypeptidique.

Les essais pratiqués sur des solutions de peptone,

déféquées, d'une part par l'acide trichloracétique, d'autre part par l'acide phosphotungstique, ont satisfait qualitativement et quantitativement aux expériences. C'est là le point de départ des techniques proposées par la plupart des auteurs.

*Méthode dite du « Double azote »
pour l'estimation de la polypeptidémie*

- La mise au point du mode opératoire de défécation trichloracétique et phosphotungstique a été effectuée par CRISTOL et PUECH (10).

Les albumines du sérum sont précipitées d'une part, au moyen d'acide trichloracétique en solution à 20 %, et d'autre part, grâce à une solution sulfurique (2/3 N) de phosphotungstate de sodium, à 10 %.

Chaque filtrat est ensuite soumis à la kjeldahlisation dans l'appareil de PARNAS et WAGNER; l'ammoniaque formée est dosée titrimétriquement par retour avec des solutions d'acide sulfurique et de soude N/70.

La différence entre la quantité d'azote correspondant au filtrat trichloracétique et celle provenant du filtrat phosphotungstique donne la quantité d'azote polypeptidique qui est ensuite rapportée au litre.

C'est là la méthode dite du « double azote ». La

(10) A. PUECH et P. CRISTOL. — Du rôle de polypeptides dans l'intoxication urémique. Indice de polypeptidémie et néphrite urémique. *Ann. de Médecine*, janvier 1929, 25, 43-69.

précision obtenue est environ de 2 mg. d'azote par litre.

FIESSINGER et MICHAUX appliquent le même mode opératoire au liquide céphalo-rachidien (11).

Leur méthode d'estimation de la polypeptidorachie étant la seule employée dans les laboratoires, nous en extrayons les passages suivants:

TECHNIQUE

« La technique employée repose sur la différence
« de précipitabilité des polypeptides par deux réac-
« tifs désalbuminants, l'acide trichloracétique et l'a-
« cide phosphotungstique. Deux échantillons de li-
« quide traités réciproquement par ces acides offrent
« donc après filtration une teneur en azote différente,
« cette différence correspondant à l'azote des poly-
« peptides.

« La technique comporte donc essentiellement deux
« dosages d'azote.

« 1° *Les précipitations.*

« La précipitation trichloracétique se fait en addi-
« tionnant un volume donné de liquide céphalo-ra-

(11) N. FIESSINGER, L. MICHAUX et M. HERBAIN. — Contribution à l'étude des méningites toxiques. La polypeptidorachie. *Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp.*, Paris, 9 mai 1930, p. 775.

« chidien d'un égal volume d'une solution trichloracétique à 20 %.

« La précipitation phosphotungstique s'effectue en mélangeant dans l'ordre:

Liquide céphalo-rachidien.	1	volume
Eau distillée.	2	—
Solution de phosphotungstate de Na à 10 %.	1	—
Acide sulfurique 0,58 N.	1	—

« Il y a avantage à opérer ces précipitations dans des flacons émeri que l'on bouche hermétiquement et que l'on abandonne en lieu frais pendant au moins six heures, la précipitation dans un liquide albumineux ainsi dilué, étant toujours lente. Le volume optimum de liquide céphalo-rachidien à utiliser est de 5 cm³, un volume inférieur rendant la filtration très délicate.

« 2° Les filtrations.

« Les liquides, après un court séjour à la température du laboratoire sont ensuite filtrés sur double filtre sans plis, et rejetés jusqu'à ce qu'ils passent limpides.

« 3° La kjeldahlisation.

« Deux tubes en pyrex reçoivent, l'un 2 cm³ de filtrat trichloracétique, l'autre 5 cm³ de filtrat phosphotungstique, ce qui, dans les deux cas correspond

« à 1 cm³ de liquide céphalo-rachidien. Chaque essai
« est additionné de 2 cm³ de mélange destructeur de
« LAUDAT (SO⁴H² - PO⁴H³ - SO⁴Cu).

« Le chauffage, mené avec les précautions ordinai-
« res, est maintenu au delà de la décoloration pen-
« dant quelques minutes..

« 4° *Le dosage.*

« Le dosage de l'ammoniaque ainsi formée se fait
« à l'appareil de PARNAS et WAGNER dont l'emploi
« est aujourd'hui courant. L'ammoniaque, déplacée
« par la potasse est entraînée par un courant de va-
« peur d'eau et reçue par distillation dans une solu-
« tion d'acide sulfurique, employée en quantité con-
« nue et en excès, excès que l'on dose ensuite par la
« soude, en présence de rouge de méthyle, en évitant
« le plus complètement possible, les erreurs dues au
« CO².

« A titre de contrôle, tous les dosages ont été faits
« en double; l'erreur expérimentale est toujours de
« l'ordre de 1 à 2 %.

« L'erreur due aux réactifs est déterminée dans un
« essai à blanc, effectué selon la technique précédente
« en remplaçant le liquide céphalo-rachidien par de
« l'eau distillée; le chiffre obtenu est retranché des ré-
« sultats ultérieurs.

« N trichloracétique — N phosphotungstique =
« N des polypeptides. »

Les résultats des dosages prouvent que le taux de
l'azote polypeptidique du liquide céphalo-rachidien

normal est voisin de zéro et ne subit des variations relativement importantes que dans des cas pathologiques tels que les insuffisances hépatiques ou rénales, et les méningites toxiques.

La critique de la méthode du double azote porte immédiatement sur le mode opératoire lui-même: la technique est longue, nécessitant une kjeldahlisation, une distillation d'ammoniaque, un titrage très rigoureux, et une opération à blanc; elle est délicate, si l'on veut éviter les multiples causes d'erreur, et un matériel relativement important est nécessaire (12-13).

Au point de vue chimique, on constate que certaines molécules azotées telles que l'urée, l'acide urique et ses dérivés ne sont pas précipitées lors des défécations, et que leur azote est dosé, après la destruction sulfurique, avec l'azote peptidique. Mais, passant également bien dans les deux filtrats, elles ne peuvent influer sur le résultat.

Cependant l'acide phosphotungstique ne laisse pas passer, comme l'acide trichloracétique, tous les acides aminés.

Dés dérivés aliphatiques comme:

la Lysine: $\text{H}^2\text{N} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CH} - \text{COOH}$

l'Arginine:

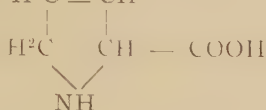
$$\begin{array}{ccccccc} & & & & & \text{NH}^2 & \\ & & & & & | & \\ \text{HN} & = & \text{C} & - & \text{NH} & - & \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ & & | & & & & | \\ & & \text{NH}^2 & & & & \text{NH}^2 \end{array}$$

(12) N. FIESSINGER, H.-R. OLIVIER et M. HERBAIN. — Les diagnostics biologiques. Paris, Norbert-Maloine, 1929, p. 340.

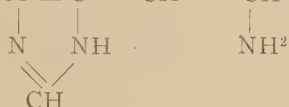
(13) P. FLEURY. — Fiches techniques de chimie biologique. Paris, Ed. Vêga, 1933. Urines, 3.

et des monopectides de la série hétérocyclique tels que:

la Proline: $\text{H}^2\text{C} - \text{CH}^2$



et l'Histidine: $\text{HC} = \text{C} - \text{CH}^2 - \text{CH} - \text{COOH}$



sont précipités. Il apparaît donc immédiatement que le chiffre d'azote sera entaché d'une erreur par excès due aux monopectides restés sur le filtre « phosphotungstique ».

D'après FIESSINGER, la dilution des solutions protidiques augmenterait le taux azoté des filtrats de défécation.

Or, pour l'estimation de la polypeptidorachie par exemple, si les prises d'essai des kjeldahlisations se rapportent toutes deux à un centimètre cube de liquide céphalo-rachidien, la défécation trichloracétique correspond à une dilution au 1/2, alors que le filtrat phosphotungstique résulte d'une dilution au 1/5; le taux azoté de ce dernier filtrat serait donc encore erroné.

Quant à la solution trichloracétique, sa concentration semble trop grande, et le magma retient par adsorption de grosses molécules polypeptidiques, dont l'azote n'est pas estimé lors du dosage. L'emploi d'une

solution plus diluée fournit, d'après GOIFFON, des résultats plus précis.

Signalons enfin les quantités optima de matières nécessaires à la méthode du double azote:

Pour l'estimation de la polypeptidémie:

10 cm³ de sérum, ce qui suppose une ponction veineuse abondante: environ 25 cm³.

La détermination de la polypeptidorachie exige 10 cm³ de liquide céphalo-rachidien, quantité parfois difficile à obtenir.

B) Méthodes colorimétriques

dont les résultats sont exprimés en Azote.

MARTENS (14) utilise, pour le dosage de l'azote peptidique la réaction colorée employée par FOLIN, pour le dosage des acides aminés.

A légère alcalinité, les acides aminés donnent, avec les sels de sodium de l'acide naphthoquinone sulfonique, une coloration jaune orangé. La technique est très minutieuse, la précision des résultats dépendant du degré d'alcalinité du milieu, qui doit être amené exactement à pH = 7,8. De longs séjours à l'étuve sont nécessaires pour faciliter la réaction.

L'hydrolyse des peptides par un acide fort conduit

(14) MARTENS. — Contribution à l'étude de l'azote peptidique du sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, 10, 1336-1372.

à une production d'acides aminés: MARTENS dose ceux-ci après défécation tungstique et obtient les mono-peptides préformés. Dans une seconde manipulation, après défécation trichloracétique, il hydrolyse le filtrat par l'acide chlorhydrique 5 fois normal, et obtient ainsi, et les mono-peptides préformés, et ceux résultant de l'hydrolyse des poly-peptides. Le dosage de l'azote des deux filtrats est effectué par la méthode de FOLIN (15-16).

CRISTOL estime que le rendement obtenu n'est pas suffisant: les molécules peptidiques ne sont pas intégralement transformées par l'hydrolyse. On peut, d'autre part, faire ici la même observation qu'à la méthode du double azote: l'acide phosphotungstique précipite certains mono-peptides, qui n'interviennent pas dans le dosage des acides aminés préformés, mais qui sont ensuite dosés avec les mono-peptides résultant de l'hydrolyse. L'erreur par excès est importante.

Quant à la coloration elle-même, elle est difficilement appréciable, les réactifs employés réagissant l'un sur l'autre pour donner des dérivés colorés.

La qualité des produits dosés par la réaction de FOLIN est mal définie; aussi la méthode est-elle trop imprécise pour pouvoir effectuer un double dosage.

Les méthodes employées pour doser l'azote des po-

(15) D'après J. TRIVAS. — *Thèse Faculté Médecine, Montpellier*, 1928.

(16) MARTENS. — Les principaux facteurs de régulation de l'acido-acidémie et de la poly-peptidémie. *Arch. int. Méd., exp.*, VIII, fasc. 3, 1933.

lypeptides sont donc relativement imprécises: la défécation en retenant dans les coagula une certaine quantité de matières peptidiques, diminue le taux azoté des filtrats. D'autre part, la complexité des techniques et le volume important de matières nécessaires à l'analyse, sont autant d'obstacles à l'estimation des polypeptides; les méthodes colorimétriques de mesure de l'index tyrosine ne présenteront pas ces inconvénients.

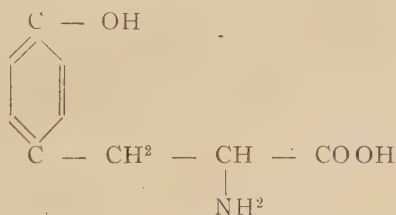
2^o Exposé et critiques des méthodes dont les résultats sont exprimés en Tyrosine

Après avoir critiqué les méthodes dosant l'azote polypeptidique, GOIFFON et SPAEY, puis LEFAUX ont proposé des techniques colorimétriques simples, permettant d'estimer non plus l'azote des polypeptides, mais un seul peptide de détermination facile, grâce à ses réactions colorées intenses: la tyrosine.

Ainsi donc, la notion d'azote polypeptidique fait place à une nouvelle interprétation, celle de l'index-tyrosine du liquide biologique envisagé.

La tyrosine

La tyrosine ou acide phénoxy- α -aminopropionique, est un aminophénol, lévogyre, et cristallisé comme tous les acides aminés. Son pH est à 5,4.



C'est le moins soluble des acides aminés; assez soluble dans l'eau à chaud, elle est presque insoluble dans l'alcool, mais se dissout assez facilement dans les acides et dans les alcalis.

Réactions colorées:

1° Avec le réactif de MILLON au nitrate acide de Hg., elle donne un précipité rouge brique. *

2° Avec le réactif des phénols de FOLIN et DENIS modifié par WU, on obtient en milieu alcalin une coloration bleue intense.

3° La réaction xanthoprotéique, avec NO^3H concentré donne une coloration jaune par formation d'un dérivé nitré de la fonction phénol.

Ces trois réactions sont positives avec toutes les matières protéiques contenant de la tyrosine comme molécule intégrante. L'analyse et la synthèse ont en effet prouvé qu'il existait des molécules complexes à noyau tyrosinique. En ce qui concerne les peptides, CRISTOL signale comme exemples:

Un tripeptide: la glycyl-tyrosyl-glycine;

Un térapeptide: la glycyl-tyrosyl-glycyl-alanine;

Un pentapeptide: la leucyl-triglycyl-tyrosine;

complexes dont la fonction phénol, caractéristique de la tyrosine, peut être mise en évidence et par conséquent dosée.

A) Méthode de Goiffon

GOIFFON (17) utilise le réactif des phénols de FOLIN et WU, solution d'acide phosphomolybdotungs-

(17) R. GOIFFON et J. SPAEY. — Mesure de l'Index-Tyrosine des polypeptides sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 1675.

tique, pour mettre en évidence la tyrosine sérique, et la doser comparativement à une solution étalon.

Le principe de la défécation est le même que dans la méthode du double azote de CRISTOL. Mais le sérum est traité par des solutions trichloracétique et phosphotungstique de concentrations voisines, et le volume final, identique dans les deux cas, correspond à une dilution au 1/10.

Les filtrats résultant de la désalbumination sanguine sont traités par le réactif des phénols; l'alcalinisation provoque le développement d'une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protides mise en jeu.

MODE OPÉRATOIRE

Le principe de la technique est le suivant:

1 cm³ de sérum est traité par 9 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 30 gr. par litre. Une seconde prise d'essai équivalente est traitée par 9 cm³ de solution chlorhydrique d'acide phosphotungstique à 22 gr. par litre. On filtre au bout d'un quart d'heure.

5 cm³ de chacun des deux filtrats (limpides), correspondant à 0 cm³ 5 de sérum, sont traités respectivement par deux gouttes de réactif des phénols, puis alcalinisés au moyen de 4 cm³ de solution de carbonate de sodium à 10 %. Au bout d'une heure, on compare au colorimètre de DUBOSQ, avec 5 cm³ de solu-

tion de tyrosine à 0 gr. 010 par litre. La coloration bleue développée est maximum après addition d'une goutte de solution de sulfite de sodium.

Soit H et H' les hauteurs pour lesquelles le liquide étalon et les liquides à doser ont même intensité colorée.

$$\frac{H}{H'} \times 100 = \text{nombre de mg. de tyrosine par litre de sérum}$$

On soustrait le taux de tyrosine obtenu avec le filtrat phosphotungstique du taux fourni par le filtrat trichloracétique pour obtenir l'index tyrosine sérique.

On remarquera que la tyrosine n'est pas le seul corps sensible à cette réaction: l'acide urique, ses dérivés immédiats, alloxane et alloxanthine, les corps phénoliques naturels et provenant de médicaments, des dérivés sulfurés, le tryptophane libre donnent avec le réactif des phénols la même réaction colorée et en augmentent l'intensité.

D'ailleurs le principe de la méthode de GRIGAUT, pour le dosage de l'acide urique sanguin est basé sur le développement d'une teinte identique.

Mais tous les corps précités passent quantitativement bien dans les deux filtrats. GOIFFON l'a prouvé en ajoutant aux liquides à doser des quantités connues d'acide urique qui ont été exactement retrouvées lors du dosage.

Utilisée fréquemment dans les laboratoires, la mé-

thode de GOIFFON, grâce à sa simplicité et à sa rapidité a donné à la notion nouvelle d'index tyrosine une grande importance en biologie expérimentale.

Réactifs:

1° Réactif des phénols, de FOLIN et DENIS, modifié par WU.

Tungstate de sodium.	100 gr.
Molybdate de sodium.	25 gr.
Eau distillée.	700 cm ³

Après dissolution, ajouter:

Acide orthophosphorique à 85 % . .	50 cm ³
Acide chlorhydrique concentré. . . .	100 cm ³

Faire bouillir au réfrigérant ascendant pendant 8 heures. La solution jaune est diluée avec de l'eau distillée jusqu'à un litre.

2° Acide phosphotungstique 22 gr. + acide chlorhydrique normal 30 cm³ + eau q. s. pour un litre.

3° Solution d'acide trichloracétique à 30 gr. par litre.

4° Solution de carbonate de sodium cristallisé à 10 %.

5° Solution aqueuse saturée de sulfite de sodium.

6° Solution étalon de tyrosine: 0 gr. 010 de tyrosine dissous dans 1.000 cm³ de ClH décinormal.

B) Méthode de Lefaux

LEFAUX préconise une autre réaction du groupement phénoxy-: la réaction xanthoprotéique (18).

Les phénols donnent avec l'acide nitrique concentré à l'ébullition, un dérivé nitré jaune clair, devenant jaune foncé par passage en milieu alcalin; la tyrosine et le groupement tyrosinyl- des matières protéiques, grâce à leur fonction phénol, se prêtent à cette réaction.

Sur les filtrats de défécation trichloracétique et phosphotungstique obtenus comme dans le premier temps de manipulation du mode opératoire de GOIFFON, mais avec une dilution au 1/5, on pratique la réaction xanthoprotéique.

Les colorations obtenues sont comparées à celle d'une solution de tyrosine étalon traitée de façon identique; la différence des intensités colorées représente l'index tyrosine des polypeptides du sérum.

(18) R. LEFAUX. — Nouvelles mesures de l'Index-Tyrosine des polypeptides sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, décembre 1935, 1822.

Réactifs:

- 1° Acide azotique pur.
- 2° Lessive de soude ordinaire.
- 3° Solution d'acide trichloracétique à 30 gr. par litre.

4° Solution d'acide phosphotungstique:

Acide phosphotungstique.	22 gr.
Acide chlorhydrique normal	30 cm ³
Eau distillée q. s. p.	1.000 cm ³

5° Solution étalon de tyrosine:

Tyrosine: 0 gr. 050 dissous dans 1.000 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 30 gr. pour 1.000 cm³.

TECHNIQUE

« Dans un premier tube à centrifuger, on introduit:
2 cm³ de sérum + 8 cm³ de la solution d'acide trichloracétique.

« Dans un deuxième tube à centrifuger:
2 cm³ de sérum + 8 cm³ de la solution phosphotungstique.

« On filtre ou on centrifuge fortement au bout de
« 15 minutes. On prélève 5 cm³ de chacun des fil-
« trats qu'on introduit dans deux tubes à essais

« « Pyrex ». On ajoute dans chacun d'eux un centi-
« mètre cube de la solution de tyrosine à 0 gr. 050
« pour 1.000, puis 1 cm³ 5 exactement d'acide azo-
« tique pur.

« On porte à légère ébullition pendant quelques se-
« condes, on refroidit bien et on ajoute goutte à
« goutte et en agitant 2 cm³ 2 exactement de lessive
« de soude. Une coloration jaune se développe im-
« médiatement, coloration d'ailleurs très stable.

« On compare au colorimètre de DUBOSQ avec
« 1 cm³ 5 de la solution de tyrosine à 0 gr. 050 pour
« 1.000, auxquels on ajoute 4 cm³ 5 de la solution
« d'acide trichloracétique à 30 gr. par litre, puis
« comme plus haut, 1 cm³ 5 de l'acide azotique; on
« porte à l'ébullition, puis on ajoute 2 cm³ 5 de les-
« sive de soude.

« Soit H et H' les épaisseurs sous lesquelles le li-
« quide étalon et les liquides inconnus ont même in-
« tensité colorée:

$$\left(\frac{H}{H'} \times 40 \right) - 20 = \text{nombre de mg. de tyrosine} \\ \text{par litre de sérum.}$$

« Ces dosages étant faits, nous aurons la quantité
« de tyrosine correspondant aux polypeptides du sé-
« rum considéré, en retranchant la valeur obtenue
« pour le filtrat phosphotungstique de celle obtenue
« pour le filtrat trichloracétique. »

Seuls les phénols et le tryptophane libre donnent la
coloration jaune. La réaction, plus spécifique que celle

de GOIFFON, est très sensible, et la coloration nettement perceptible avec 0 mg. 01 de tyrosine.

*Quelques observations au sujet des résultats obtenus
par les méthodes chimiques et colorimétriques.*

1° Il n'est pas possible de songer à un rapport entre les quantités d'azote peptidique sanguin et rachidien. Dans la communication « La Barrière méningée aux Polypeptides », FIESSINGER démontre que ce rapport n'a pas de valeur clinique, le passage du sang au liquide céphalo-rachidien étant des plus irréguliers: « il existe peut-être un seuil normal, mais à l'état pathologique, cette notion ne peut être invoquée en raison des multiples facteurs qui l'influencent » (6).

Au point de vue chimique d'ailleurs, la différence de densité protidique du sang et du liquide céphalo-rachidien ne permet pas de comparaison absolue entre les quantités d'azote, si, toutefois, cette densité a une influence sur le dosage.

2° Il semble très difficile de pouvoir transformer systématiquement l'index tyrosine en index azote polypeptidique.

Si certains cas pathologiques rares sont marqués d'une quantité d'azote polypeptidique élevée, avec un

(6) N. FIESSINGER. — La barrière méningée aux polypeptides. Ouvrage déjà cité.

index tyrosine très faible, ou inversement, on peut néanmoins affirmer que, généralement, tyrosine et azote peptidique varient dans le même sens.

Ayant obtenu l'index tyrosine d'un liquide protidique, il faudrait, pour se faire une idée de l'ordre de grandeur du taux d'azote correspondant, en multiplier le chiffre par trois environ. D'après GOIFFON, le coefficient, tout relatif, oscille entre 2,8 et 3,5 (17).

(17) R. GOIFFON et J. SPÆY. — Mesure de l'index-tyrosine des polypeptides sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 1675.

DEUXIÈME PARTIE

MESURE
DE L'INDEX TYROSINE
POLYPEPTIDIQUE
RACHIDIEN

CHAPITRE PREMIER

Adaptations des Méthodes colorimétriques au liquide céphalo-rachidien

1° Adaptation de la méthode de Goiffon.

Critiques

Le procédé du double azote nécessite des ponctions lombaires trop importantes; il ne faut pas songer à diminuer le volume des prises d'essai, ce qui augmenterait encore des causes d'erreur déjà considérables; de plus, sur la quantité de liquide à analyser, d'autres examens sont généralement pratiqués: il est donc nécessaire d'employer une technique où les prises d'essai seront aussi minimales que possible. D'ailleurs, à part quelques cas d'hypertension rachidienne, où la ponction permet d'obtenir un volume important de liquide, le laboratoire n'en reçoit que quelques centimètres cubes.

C'est pourquoi nous avons d'abord adapté au liquide céphalo-rachidien le mode opératoire de GOIFFON qui ne devait employer que 2 cm³, et qui nous

avait fourni d'excellents dosages de l'index tyrosine sérique.

D'importantes difficultés apparurent dès les premiers essais.

Comparé au liquide céphalo-rachidien, le sang est riche en polypeptides: des doses de 15 à 25 mg. de tyrosine par litre de sérum sont courantes sinon même normales, alors que d'après des travaux antérieurs, l'azote rachidien dépasse rarement quelques milligrammes, dans les conditions physiologiques habituelles.

De fait, les colorations obtenues avec le réactif des phénols étaient trop peu intenses et rendaient le dosage très délicat, même avec des prises d'essai de 2 cm³.

Employer un volume plus important était difficile, c'est pourquoi nous avons légèrement modifié la technique précitée en ajoutant aux filtrats trichloracétique et phosphotungstique une quantité fixe de tyrosine telle que l'intensité de la coloration développée avec le réactif des phénols fût comparable à celle de la solution étalon.

TECHNIQUE

Deux prises d'essai de 2 cm³ de liquide céphalo-rachidien sont respectivement déféquées dans des tubes à centrifuger par un égal volume, l'une d'acide trichloracétique en solution à 30 pour 1.000, l'autre d'une solution d'acide phosphotungstique à 22 gr. pour 1.000.

Après 5 à 6 heures de repos à la glacière, et centrifugation, 2 cm³ de liquide clair, correspondant à 1 cm³ de liquide céphalo-rachidien, sont introduits dans un tube à essai, avec 2 cm³ de solution étalon de tyrosine à 10 mg. par litre. On traite de façon identique le second liquide centrifugé, ainsi que l'étalon colorimétrique (4 cm³ de solution de tyrosine). On ajoute à chaque tube deux gouttes de réactif des phénols, et on termine la manipulation conformément au mode opératoire de GOIFFON. Le volume final est amené à 10 cm³ avec de l'eau distillée.

Soit H et H' les hauteurs pour lesquelles le liquide à doser et la solution étalon ont même intensité colorée:

$$\left(\frac{H}{H'} \times 40\right) - 20 = \text{nombre de mg. de tyrosine par litre.}$$

L'index tyrosine est obtenu en retranchant le chiffre correspondant au filtrat phosphotungstique du chiffre fourni par la liqueur trichloracétique.

Critique des résultats:

Les dosages pratiqués suivant ce mode opératoire ne nous donnaient pas entière satisfaction: les essais à blanc effectués sur la solution de tyrosine étalon nous avaient cependant permis de retrouver exactement les quantités de tyrosine mises en jeu. Mais les index rachidiens trouvés paraissaient exagérés, même en se rap-

portant aux résultats de PRUNELL (19) qui estime que le taux d'azote peptidique du liquide céphalo-rachidien normal est de 5 à 9 mg. par litre.

La méthode de GOIFFON prouverait que l'index tyrosine d'un tel liquide varie de 1 à 3 mg.

Nous avons vu que le réactif des phénols n'était pas caractéristique du noyau phénolique seul et que de nombreux corps donnaient avec lui des réactions colorées; cette intensité colorée secondaire est très importante, puisqu'elle fournit près de 50 % de l'intensité totale.

Etant donné le manque de spécificité du réactif de FOLIN et WU, nous avons préféré la technique de LEFAUX, plus sensible, les essais étant nettement positifs avec des quantités de tyrosine beaucoup plus faibles. L'acide nitrique d'autre part, ne réagit que sur le noyau phénoxy — et sur le tryptophane libre, ce qui élimine un certain nombre de causes d'erreurs.

2° Modifications personnelles

de la méthode de Lefaux

Après de nombreux essais, nous nous sommes arrêtés au mode opératoire suivant qui nous a donné les meilleurs résultats, en nous offrant le maximum de garanties.

(19) A. PRUNELLI. — Dissociation cyto-polypeptidique. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, p. 1516.

Réactifs:

1° Solution d'acide trichloracétique à 30 gr. p. 1.000.

2° Solution d'acide phosphotungstique Merck:

Acide phosphotungstique . . . 22 gr.

Acide chlorhydrique normal . . . 30 cm³

Eau distillée q. s. pour faire. 1.000 cm³

3° Solution étalon de tyrosine Merck:

Tyrosine: 0 gr. 010 dissous dans 1.000 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 30 gr. par litre.

4° Acide nitrique pur.

5° Solution aqueuse saturée de potasse (sensiblement à 50 %).

TECHNIQUE

Il est nécessaire de déféquer le liquide dès son arrivée au laboratoire, et de manipuler aussi stérilement que possible surtout dans les cas de méningites infectieuses.

Dans un premier tube à centrifuger, on introduit 2 cm³ de liquide céphalo-rachidien et 2 cm³ de solution d'acide trichloracétique.

Dans un second tube, 2 cm³ de liquide céphalo-rachidien et 2 cm³ d'acide phosphotungstique.

Après légère agitation, on porte à la glacière. Après 6 heures au moins de repos à 0°, la défécation étant terminée, on laisse les tubes revenir à la température du laboratoire, ce qui demande une demi-heure environ. On centrifuge ensuite rapidement pendant 4 à 5 minutes pour que le précipité adhère bien au fond des tubes.

2 cm³ de chacun des liquides surnageants (correspondant à 1 cm³ de liquide céphalo-rachidien) sont introduits respectivement dans deux tubes en verre « Pyrex ». A chacun d'eux, on ajoute 2 cm³ de solution étalon de tyrosine et 1 cm³ d'acide nitrique. On porte à légère ébullition pendant 15 secondes environ; après refroidissement complet, on ajoute 3 cm³ d'eau distillée, et 2 cm³ de solution de potasse. Le volume final est de 10 cm³.

On compare chaque liquide au colorimètre de DUBOSQ avec 4 cm³ de solution étalon de tyrosine traitée par l'acide nitrique comme ci-dessus.

Soit H l'épaisseur du liquide étalon et H' celle du liquide à doser, quand l'égalité de teinte est obtenue.

La formule $\left[\left(\frac{H}{H'} \times 40 \right) - 20 \right]$

permettra de calculer le nombre de milligrammes de tyrosine par litre de liquide céphalo-rachidien. Soit

$$\left[\left(\frac{H}{H'} \times 40 \right) - 20 \right]$$

le nombre de mg. fourni par le liquide trichloracé-

tique, et $\left[\left(\frac{h}{h'} \times 40 \right) - 20 \right]$

le chiffre correspondant au filtrat phosphotungstique. La différence entre les deux quantités donne l'index tyrosine du liquide analysé.

$$\left[\left(\frac{H}{H'} \times 40 \right) - 20 \right] - \left[\left(\frac{h}{h'} \times 40 \right) - 20 \right] =$$

Nombre de milligrammes de tyrosine rachidienne par litre de L. C. R

Discussion

1° Défécation.

La concentration de la solution d'acide trichloracétique semble être optimum; elle est d'ailleurs comparable à celle de la solution phosphotungstique.

Nous avons traité parallèlement un même liquide céphalo-rachidien par la solution à 30 p. 1.000 et et par la solution à 20 % employée par FIESSINGER dans son estimation de la polypeptidorachie. Les résultats sont légèrement différents et notre méthode donne des chiffres supérieurs: il est possible que la solution concentrée précipite une partie des grosses molécules peptidiques qui sont retenues alors dans le coagulum.

La quantité de défécants employés pour faire une dilution de liquide céphalo-rachidien au $1/2$ est nettement suffisante, puisque pour déféquer un volume de 2 cm^3 , nous employons 0 gr. 06 d'acide trichloracétique pour précipiter moins de 5 mg. de matières protéiques dans les liquides les plus albumineux. Nous avons de même vérifié que la précipitation par la solution phosphotungstique est totale.

Le séjour minimum de 6 heures à la glacière ou en lieu très frais est nécessaire pour la précipitation complète des albumines; dans un liquide de densité protidique aussi faible que celle du liquide céphalo-rachidien, cette précipitation est très lente; des dosages effectués avant ce délai prouvent une coagulation inachevée, surtout pour la défécation trichloracétique.

Quant à la centrifugation, elle offre des avantages opératoires évidents:

a) 4 cm^3 de liquide céphalo-rachidien suffisent au dosage. Une quantité bien supérieure serait nécessaire pour la filtration. Rappelons que le volume optimum employé pour la méthode du double azote est de 10 cm^3 .

b) On obtient dans le minimum de temps, les liquides clairs indispensables à l'exactitude des dosages.

2° Solution étalon de tyrosine à 0 gr. 010 p. 1.000.

La solution employée par LEFAUX (à 0 gr. 050 p. 1.000) nous donnait des colorations trop in-

tenses pour pouvoir apprécier facilement de faibles quantités de tyrosine polypeptidique.

L'addition aux tubes à doser de 2 cm³ de solution étalon à 0 gr. 010 p. 1.000 et l'emploi de 4 cm³ du même liquide comme témoin, nous ont permis des examens colorimétriques nets et faciles.

A la solution chlorhydrique proposée par GOIFFON, rapidement altérable, nous avons préféré la solution trichloracétique de LEFAUX beaucoup plus stable: des prises d'essai effectuées sur une solution trichloracétique vieille de six mois, ont permis de retrouver exactement les quantités de tyrosine mises en jeu.

3° Emploi de la solution de potasse.

Nous avons essayé d'alcaliniser la solution nitrique, d'abord avec la lessive de soude, conformément au mode opératoire de LEFAUX: la coloration obtenue était satisfaisante, bien qu'un peu pâle.

L'ammoniaque qu'il fallait employer en plus grandes quantités, donnait une teinte jaune citron, nettement insuffisante pour l'appréciation colorimétrique.

La potasse, au contraire, nous a fourni une belle coloration jaune or très stable. La formation de nitrate de potassium cristallisant immédiatement, et gênant le dosage n'a pas lieu si l'on a soin d'amener le volume des tubes à 8 cm³ avec de l'eau distillée, avant de passer en milieu alcalin avec la solution de potasse. La concentration de cette solution doit être suffisante

pour que 2 cm³ exactement mesurés, donnent la teinte optimum.

La durée de la manipulation ne dépasse pas 30 minutes et le dosage de l'index tyrosine polypeptidique du liquide céphalo-rachidien se présente dans les laboratoires, comme une analyse courante.

Grâce à la méthode ainsi modifiée, nous avons pu suivre aisément l'évolution des réactions méningées de nombreux malades, et établir avec la plus grande netteté, la lecture colorimétrique permettant d'apprécier aisément une fraction de milligramme, les variations de la tyrosine polypeptidique rachidienne.

Remarque. — Si, pour le sang, il est difficile de trouver un coefficient qui, l'index tyrosine étant dosé, permette d'avoir un aperçu de l'ordre de grandeur du taux d'azote polypeptidique, il semble impossible de l'envisager pour le liquide céphalo-rachidien.

Le taux d'azote peptidique rachidien est en effet fourni par des molécules albumineuses riches en acides aminés divers, dont la tyrosine, puis dans les cas pathologiques par la dégradation de globulines plus riches encore en azote peptidique, notamment par leur teneur en glycoColle.

Pour le dosage colorimétrique, les albumines fourniront inversement une réaction xanthoprotéique beaucoup plus intense que celle des globulines qui renferment moins de molécules tyrosiniques.

Dans ces conditions, il est évidemment fastidieux d'établir un rapport entre des éléments qui, bien que

variant dans le même sens, dépendent étroitement de la composition des molécules protidiques.

Comparaison des résultats obtenus

par les deux méthodes colorimétriques

En traitant un même sérum par l'acide nitrique d'une part et par le réactif des phénols, d'autre part, dans les conditions opératoires précitées, LEFAUX a obtenu des résultats à peu près identiques. La comparaison des chiffres montre cependant une légère différence (ni parallèle, ni constante) : les quantités de tyrosine estimées par la méthode de GOIFFON se trouvent soit en excès, soit en défaut vis-à-vis de celles obtenues par la méthode xanthoprotéique. Les variations, de 1 à 2 mg. n'ont pas grande importance pour la valeur de l'index tyrosine sérique, surtout quand les doses trouvées sont supérieures à 15 ou 20 mg.

Dans le liquide céphalo-rachidien, nous avons observé une différence qui, tout en étant du même ordre, est beaucoup plus importante, étant donné les quantités relativement faibles de tyrosine à doser.

Nous avons effectué sur les mêmes liquides (provenant des malades atteints d'oreillons) des dosages comparatifs par les deux méthodes colorimétriques : nous avons toujours constaté que la méthode de GOIF-

FON donnait des chiffres supérieurs à celle de LEFAUX.
En voici quelques exemples:

Chiffres obtenus avec:

Réactif des phénols —	Réaction xanthoprotéique —
1,5	0,2
1,4	0,3
2	0,5
1	0,1
4,5	1,4
exprimés en mg. de tyrosine par litre.	

Nous avons, de plus, trouvé par la première technique, dans des cas de méningites ourliennes, des quantités de tyrosine atteignant 8 mg. 5, alors que par la réaction xanthoprotéique les doses maxima obtenues pour des cas pathologiques identiques ont toujours été inférieures à 5 mg. 5.

Comme on en juge par ces résultats, les intensités colorées fournies par les deux méthodes ne sont pas comparables. Néanmoins, les résultats croissent dans le même sens, suivant des courbes différentes, et s'il n'y a pas proportionnalité, c'est, à notre avis qu'à l'encontre de la méthode de LEFAUX, la technique utilisant le réactif des phénols n'est pas spécifique de la tyrosine et que la coloration est en partie attribuable à d'autres molécules, en particulier aux molécules d'origine purique.

CHAPITRE II

Résultats obtenus avec la réaction xanthoprotéique. Relation de l'index tyrosine avec les autres éléments rachidiens

D'après FIESSINGER, le taux d'azote polypeptidique rachidien normal est très voisin de zéro. Pour PRUNELL dans les conditions physiologiques normales, ce taux oscille entre 5 et 8 mg. par litre.

Nos résultats nous ont permis de vérifier que l'index tyrosine d'un liquide céphalo-rachidien normal est inférieur à 2 mg., en considérant comme tel un liquide dont le taux d'albumine est de 0 gr. 20 pour 1.000, la cytologie de 2 lymphocytes au mm^3 , et dont la réaction de floculation au benjoin colloïdal est négative dans les zones syphilitique et méningée.

Nous rappelons que la plupart des observations publiées au sujet de la polypeptidorachie, concerne surtout des cas pathologiques chroniques: maladies mentales, paralysie générale, où la dissociation cyto-poly-

peptidique (dissociations tissulaire et cellulaire) provoque l'hyperpolypeptidorachie.

En établissant l'index tyrosine polypeptidique du liquide céphalo-rachidien, nous avons constaté une concordance avec les résultats obtenus par d'autres examens de laboratoire.

Comme nous l'avons signalé, dans les affections chroniques le taux peptidique n'a aucun rapport avec les autres éléments rachidiens.

Il résulte de l'examen des cas aigus (méningites toxiques) que si la réaction au benjoin ne varie pas absolument comme les autres éléments, l'index tyrosine semble en relation directe avec une cytologie élevée et surtout avec l'hyperalbumine.

Le dosage de l'index tyrosine rachidien nous a fourni des résultats qui le justifie.

1° Oreillons et méningites ourliennes.

Dans ces cas pathologiques, le taux de l'albumine, la cytologie et l'index tyrosine sont sensiblement les mêmes que pour le liquide normal. Avec l'apparition des signes méningés, tous ces éléments croissent dans le même sens.

Toutes les quantités de tyrosine sont exprimées en milligrammes par litre de liquide céphalo-rachidien.

Provenance	Dates	Nombre d'éléments au mm ³	Albumine en gr. par litre	Index tyrosine en mg. par litre
Liquide normal		2	0,20	0 à 2
Oreillons n° 1.....		2	0,20	0,1
— n° 2.....		1	0,20	0,1
— n° 3.....		2	0,20	1,1
— n° 4.....		1	0,20	0,2
— n° 5.....		2	0,30	0,5
— n° 6.....		1	0,25	0,1
— n° 7.....		1	0,20	0,3
— n° 8.....		3	0,30	3
Méningites ourliennes				
n° 1		100	0,30	2
n° 2		140	0,40	4
n° 3		8	0,30	2,5
Malade X(*) n° 4...	9-3-36	1.000	0,55	4,5
	21-3-36	300	0,30	2,7
	28-3-36	3	0,20	0,5

(*) Evolution de la réaction méningée du même malade.

2° *Méningites tuberculeuses:*

L'index tyrosine polypeptidique est beaucoup plus élevé. La relation avec les autres éléments dosés est plus évidente encore:

Malade X	Date	Albumine en gr. p. 1000	Eléments au mm ³	Index tyrosine en mg. p. 1000
	23-3-36	2	»	8
	25-3-36	2,20	260	10
	28-3-36	2,40	300	10,2
	(*)			

(*) Jour de la mort.

Avec la méningite à pneumocoques, les résultats sont semblables; c'est en examinant un liquide pneumococcique que nous avons trouvé l'index tyrosine le plus élevé: 13 mg.

3° Observation sur les variations de l'index tyrosine polypeptidique au cours d'une méningite cérébro-spinale (Méningocoque A).

L'index tyrosine croît sensiblement comme le taux d'albumine; la cytologie est difficile à évaluer, le liquide étant abondamment purulent. La quantité de tyrosine décroît rapidement avec l'apparition et le nombre des lymphocytes.

Date des ponctions	Albumine en gr. par litre	Formule (cytologie)	Index tyrosine en mg. par litre	Méningite cérébrospinale
26-8-36	1,60	Polynucléaires altérés	5	1 ^{re} phase
27	1,70	Id.	7	
28	1,20	Id.	3 (*)	
29	2	Id.	6	
30	2	Id.	15 (**)	
31	1,50	Id. quelques lymphocytes	12,5 (**)	
1-9-36	0,50	Id.	6	
7	0,50	Nombreux lymphocytes	4	2 ^e phase (rechute)
29-9-36	1,20	Polynucléaires altérés	3	
2-10-36	1,40	Id.	4,5	
3-10-36	1,60	Id.	7	
5-10-36	1,80	Id.	9,5 (***)	

(*) Chiffre obtenu après ponction sous-occipitale ayant fourni un liquide légèrement opalescent, alors que pour les autres dosages, le liquide obtenu par ponction lombaire est nettement purulent.

(**) Le malade a reçu après la ponction lombaire du 29, une injection de sérum antiméningococcique A. Les chiffres élevés des dosages suivants correspondent à l'assimilation et à l'absorption des protéines du sérum injecté.

(***) Date de la mort.

L'index tyrosine sérique, le 29-8, est de 28 mg. par litre.

4° Signalons enfin les résultats obtenus sur des liquides provenant de réactions méningées diverses:

Polyomyélite: l'index reste au voisinage de la normale et varie de 0 à 2 mg. Un seul examen nous a fourni 5 mg. de tyrosine par litre.

Spirochétose ictéro-hémorragique: 4 à 8 mg.

Méningite aiguë: l'index-tyrosine suit exactement la courbe de l'évolution pathologique:

Dates des ponctions	Index tyrosine
31-8-36	3
2-9-36	6
3-9-36	12
11-9-36	7
19-9-36	5
29-9-36	0,5

De ces divers examens nous pouvons tirer les observations suivantes:

Dans les méningites toxiques, à forme infectieuse et à évolution rapide, l'index tyrosine croît régulièrement jusqu'à la phase aiguë, où la quantité de polypeptides est à son taux maximum. Il n'est pas douteux que la toxicité des molécules peptidiques ait une importance considérable dans la pathologie de cette période.

La tyrosine polypeptidique, l'albumine, et la cyto-
logie des méningites toxiques forment un groupe relatif d'éléments dont les variations identiques sont expérimentalement constatées.

CONCLUSIONS

Dans la première partie, nous avons exposé les propriétés chimiques et biologiques des polypeptides, qui sont à la base des recherches quantitatives. D'après l'étude des méthodes classiques de dosages, nous avons formulé les critiques suivantes:

1° Méthodes dosant l'azote polypeptidique.

La concentration trop forte de la solution trichloracétique favorise la précipitation des grosses molécules peptidiques, dont l'azote devrait intervenir dans le dosage.

La solution d'acide phosphotungstique retient de même sur filtre un certain nombre de molécules aminées simples.

La dilution différente des liquides protidiques, lors de la défécation (méthode du double azote), doit exagérer le taux d'azote du filtrat phosphotungstique.

Les précautions opératoires rigoureuses, pour éviter les pertes d'ammoniaque, et la carbonatation des solutions alcalines titrantes rendent la technique de CRISTOL, longue et délicate.

2° Méthodes colorimétriques:

Grâce à GOIFFON, la notion nouvelle d'index tyrosine polypeptidique a pu donner une approximation

suffisante pour la clinique. Cependant il nous a paru que la méthode, tout en étant satisfaisante pour l'estimation de la polypeptidémie, n'était pas suffisamment sensible pour être appliquée à des liquides de densité protidique faible, le réactif des phénols n'étant pas spécifique de la tyrosine.

La réaction xanthoprotéique adaptée au dosage par LEFAUX, est plus exacte et donne de meilleurs résultats.

Dans les deux techniques, la défécation est obtenue en tenant compte des critiques formulées pour la méthode du double azote.

Dans la seconde partie, nous démontrons qu'à côté de l'index tyrosine polypeptidique sérique, il était nécessaire d'envisager un index rachidien de même valeur qualitative, permettant de comparer la teneur des deux liquides en polypeptides.

La méthode de LEFAUX, modifiée et adaptée au liquide céphalo-rachidien, nous a permis de mettre au point un mode opératoire rapide et précis, n'utilisant qu'une quantité minimum de produit à analyser.

La technique, expérimentée sur des liquides provenant de méningites toxiques, nous a fourni les résultats suivants:

L'index tyrosine d'un liquide céphalo-rachidien normal est voisin de zéro. Dans les affections méningées aiguës, la tyrosine polypeptidique croît comme le taux d'albumine et le nombre d'éléments figurés.

L'examen de liquides céphalo-rachidiens où l'origine locale des polypeptides ne peut être mise en doute, nous a permis de constater des doses variant de 2 à 15 mg. de tyrosine par litre.

Ainsi nous paraissent justifiés la notion, le principe et le mode opératoire du dosage de l'index tyrosine polypeptidique du liquide céphalo-rachidien.

VU:

Nancy, le 18 décembre 1936.

Le Président de thèse,

PASTUREAU.

VU ET APPROUVÉ:

Nancy, le 19 décembre 1936.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

PASTUREAU.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER:

Nancy, le 19 décembre 1936.

Le Recteur de l'Académie,

L. BRUNTZ,

Président du Conseil de l'Université.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.	13
INTRODUCTION.	17

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES POLYPEPTIDES.....	21
---	----

<i>Chapitre I</i> — Les polypeptides.	23
---	----

1° Exposé chimique et biologique.....	23
---------------------------------------	----

<i>a)</i> Etude chimique.	23
-----------------------------------	----

<i>b)</i> Etude biologique.	27
-------------------------------------	----

2° Historique des recherches quantita- tives.	31
--	----

<i>Chapitre II.</i> — Exposé et critiques des différentes mé- thodes de dosages dont les résultats sont exprimés.	35
---	----

1° En azote.	35
----------------------	----

<i>a)</i> Méthodes de dosage chimique par kjeldahlisation.	36
---	----

<i>b)</i> Méthodes de dosage colori- métrique	42
--	----

2° En tyrosine.	45
-------------------------	----

<i>a)</i> Méthode de GOIFFON.	46
---------------------------------------	----

<i>b)</i> Méthode de LEFAUX.	50
--------------------------------------	----

DEUXIÈME PARTIE

MESURES DE L'INDEX-TYROSINE POLYPEPTIDIQUE RACHIDIEN..	55
<i>Chapitre I.</i> — Adaptation des méthodes colorimétriques au liquide céphalo-rachidien.	57
1° Adaptation de la technique de GOIFFON. — Critiques des résultats..	57
2° Modifications personnelles apportées au mode opératoire de LEFAUX. — Discussion.	60
<i>Chapitre II.</i> — Résultats obtenus; comparaison de l'index tyrosine avec les autres éléments rachidiens.. . . .	69
CONCLUSIONS.	75



SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

2, rue René d'Anjou, 2

NANCY

